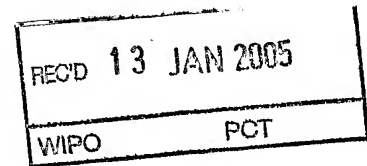


19.11.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年12月25日
Date of Application:

出願番号 特願2003-431007
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-431007]

出願人 独立行政法人科学技術振興機構
Applicant(s):

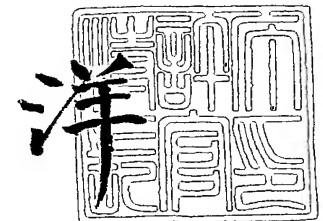


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 NP03416-JN
【提出日】 平成15年12月25日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 31/7052
A61P 37/04

【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 0 条西 1 丁目 北 1 0 条グランドハイツ 4
0 2
【氏名】 紙谷 浩之

【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市北区新琴似 7 条 1 丁目 3 番 3 5 - 7 0 1
【氏名】 原島 秀吉

【発明者】
【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 3 条西 1 丁目 3 - E 1 0 1 1
【氏名】 土谷 博之

【特許出願人】
【識別番号】 503360115
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構

【代理人】
【識別番号】 100093230
【弁理士】
【氏名又は名称】 西澤 利夫
【電話番号】 03-5778-0201

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 009911
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0316415

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

哺乳動物の免疫活性を増強させる免疫活性増強剤において、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを有効成分として含有することを特徴とする哺乳動物の免疫活性増強剤。

【請求項 2】

特殊核酸塩基は、8-オキソグアニン、8-オキソアデニン、2-オキソアデニン、5-ヒドロキシウラシル、5-ホルミルウラシル、5-ホルミルシトシン、8-ニトログアニン、チミングリコール、シトシングリコール、ヒポキサンチン、オキザニン、ピリミジンダイマー、 O^6 -メチルグアニンおよび O^4 -メチルチミンからなる群から少なくとも 1 種類が選択される請求項 1 に記載の免疫活性増強剤。

【請求項 3】

特殊核酸塩基は、微生物核酸特異的な修飾塩基である請求項 1 に記載の免疫活性増強剤。

【請求項 4】

微生物核酸特異的な修飾塩基は、 N^6 -メチルアデニン、5-ヒドロキシメチルウラシルおよび5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から少なくとも 1 種類が選択される請求項 3 に記載の免疫活性増強剤。

【請求項 5】

微生物核酸特異的な修飾塩基を含む核酸は、配列番号 4 の塩基配列を有する核酸である請求項 3 に記載の免疫活性増強剤。

【請求項 6】

微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸、または、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸を有するプラスミドを有効成分としてさらに含有する請求項 1 から 5 のいずれかに記載の免疫活性増強剤。

【請求項 7】

微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸は、配列番号 2 の塩基配列を有する核酸である請求項 6 に記載の免疫活性増強剤。

【請求項 8】

微生物が、ウイルスまたは細菌である請求項 3 から 7 のいずれかに記載の免疫活性増強剤。

【請求項 9】

細菌が、大腸菌である請求項 8 に記載の免疫活性増強剤。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤を培養細胞に投与することによって、培養細胞の免疫活性を増強させて炎症性サイトカインを生産させることを特徴とする炎症性サイトカインの生産方法。

【請求項 11】

請求項 1、2、3、4、5、8 および 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸を組込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を培養細胞に同時投与することによって、免疫活性をさらに増強させて炎症性サイトカインを生産させることを特徴とする炎症性サイトカインの生産方法。

【請求項 12】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤を培養細胞に投与することによって、免疫活性が増強され、炎症性サイトカインが生産されることを特徴とする培養細胞。

【請求項 13】

請求項 1、2、3、4、5、8 および 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸を組込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物

を培養細胞に同時投与することによって、免疫活性がさらに増強され、炎症性サイトカインを生産されることを特徴とする培養細胞。

【請求項 1 4】

培養細胞が、ヒトを含む哺乳動物由来である請求項 1 2 または 1 3 に記載の培養細胞。

【請求項 1 5】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤を哺乳動物に投与することによって、哺乳動物の免疫活性を増強させることを特徴とする哺乳動物の免疫活性の増強方法。

【請求項 1 6】

請求項 1、2、3、4、5、8 および 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を組込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を哺乳動物に同時投与することによって、哺乳動物の免疫活性をさらに増強させることを特徴とする哺乳動物の免疫活性の増強方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤を非ヒト哺乳動物に投与することによって、免疫活性が増強されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物。

【請求項 1 8】

請求項 1、2、3、4、5、8 および 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を組込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を哺乳動物に同時投与することによって、免疫活性がさらに増強されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物。

【請求項 1 9】

非ヒト哺乳動物が、マウスである請求項 1 7 または 1 8 に記載の非ヒト哺乳動物。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法

【技術分野】

【0001】

この出願の発明は、免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、この特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを用いた、免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

マウスやラット、ウサギ等の哺乳動物における免疫反応は、細菌やウイルス等の微生物、花粉や化学物質等の異物による生体への侵入および感染を防御する重要な生体反応の一つである。この免疫反応のうち、「獲得性免疫」は、これら異物に対して、多様な特異的に結合し無毒化する免疫抗体の働きを主として免疫反応を担っている。また、同じく免疫反応の一種である「自然免疫」は、自己の細胞と異物（たとえば、細菌類の構成成分）との差異を見分けて認識し、この差異に基づいて免疫反応が起こることが、近年報告されている（たとえば、非特許文献1および非特許文献2等）。このような異物の一つとして、細菌由来のDNAに含まれているCpGジヌクレオチド配列(CpG配列)がある（たとえば、非特許文献3および非特許文献4等）。

【0003】

哺乳動物の染色体DNAにおいて、このCpG配列は、統計学上で期待できる値と比べて約1/50から1/60の割合という極めて少ない頻度でのみ含まれており、また、CpG配列の殆どのシトシン塩基は、CpG配列に特異的なシトシン5-メチラーゼにより5位がメチル化されている。これに対して、細菌類（微生物）の染色体DNAに含まれているCpG配列は、統計学上で期待できる値とほぼ同等の約1/16の割合であり、しかも、CpG特異的なシトシン5-メチラーゼを持たないため、哺乳動物のようにメチル化シトシンを含まないCpG配列（非メチル化CpG配列）であることが報告されている（たとえば、非特許文献5等）。つまり、哺乳動物の自然免疫系は、このCpG配列のメチル化、もしくは、非メチル化を認識し、炎症反応が誘起（すなわち、免疫活性の増強）され、その結果、細菌類の侵入や感染から効率よく生体を防御することができる免疫反応であると考えられる。

【0004】

このような非メチル化CpG配列による免疫活性の増強を利用して、自然免疫を刺激する組成物（特許文献1）、癌免疫療法（たとえば、非特許文献6）や感染症に対する効率的なDNAワクチン（たとえば、特許文献2、非特許文献7および非特許文献8等）が報告、提案され、その有用性が確認されている。

【0005】

また、細菌等をはじめとする微生物と哺乳動物におけるDNA配列の違いは、このCpG配列以外にも存在し、たとえば、 N^6 -methyladenine (N^6 -メチルアデニン、 m^6A) が挙げられる。たとえば、大腸菌DNA中のGATC配列のアデニン (A) は、このアデニンに対して特異的に作用する酵素であるDNAアデニンメチラーゼ (Dam) により、メチル化されて m^6A となる。発明者らは、非メチル化CpG配列だけでなく、このGATC配列におけるアデニンのメチル化 (Gm^6ATC 配列) もまた、自然免疫が進化的に保存してきた非自己である異物を認識する機構の一つとして機能していると考えた。また、このような Gm^6ATC 配列によって、生体において、どのような免疫活性（生体防御反応）が誘起されるのかを研究し、解明することは、将来、大腸菌等の細菌由来のプラスミドを用いた遺伝子治療法等を確立する際に大変重要な知見となると考えられる。

【0006】

現在のところ、上記の非メチル化CpG配列以外の特殊核酸塩基を含む配列による免疫活性（生体防御反応）の誘起や促進、増強に関する研究やその報告は、ほとんどなされていないのが実情である。発明者が知る限りでは、たとえば、上記の Gm^6ATC 配列を含むDNAを

利用した免疫活性の誘起・増強に関しては、DNAアデニンメチラーゼ (Dam) に影響を及ぼす変異を含ませることにより、弱毒化されたサルモネラ菌等の病原性細菌を用いてワクチン様組成物の作成し、これを生体に投与して免疫効果を上昇させ、病原性細菌の感染の予防や治療に活用することが提案されている (特許文献3を参照)。

【0007】

しかしながら、上記の特許文献3記載によるワクチン様組成物は、DNAアデニンメチラーゼの変異を含ませることにより弱毒化させた病原性細菌からなるものであるため、その効果は、このワクチン様組成物の由来となる病原性細菌に対しての免疫活性 (生体防御反応) を上昇させるものであるため、特定の感染症に対してのみ効果を発揮するものであり、生体全体の免疫活性を増強させ、種々の感染症に対しても効果を発揮することができるものではない。つまり、依然として微生物核酸特異的な修飾塩基等をはじめとする特殊核酸塩基を含む核酸、または、その核酸を有するプラスミド等を投与して、免疫活性を誘起、増強させることは知られていない。

【特許文献1】特表2003-527352号公報

【特許文献2】特表2002-511841号公報

【特許文献3】特表2002-536339号公報

【非特許文献1】Werling, D., and Jungi, W. T., Vet. Immunol. Immunopathol. 91: 1-12, 2003

【非特許文献2】Poltorak, A., et al., Science, 282: 2085-2088, 1998

【非特許文献3】Hemmi, H., et al., Nature, 408: 740-745, 2000

【非特許文献4】Kreig, A., et al., Nature, 374: 546-549, 1995

【非特許文献5】Bird, A. P., Trends Genet., 3: 342-347, 1987

【非特許文献6】Whitmore, M., Li, S., and Huang, L., Gene Ther., 6: 1867-1875, 1999

【非特許文献7】Brunner, C., et al., J. Immunol. 165: 6278-6286, 2000

【非特許文献8】Kojima, Y., et al., Vaccine, 20: 2857-2865, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、従来の問題点を解消し、特殊核酸塩基を含む核酸、または、そのような塩基を有するプラスミドを有効成分として、哺乳動物に投与することにより、哺乳動物の生体全体の免疫活性を増強させることができ、癌免疫療法や遺伝子治療、種々の感染症に対しても効果的なDNAワクチン等に应用することができる哺乳動物の免疫活性増強剤およびこれを利用した免疫活性の増強方法を提供することを課題としている。

【0009】

また、この出願の発明は、上記の免疫活性増強剤を利用して、in vitroにおける免疫活性の誘起や増強等に関する研究のモデル細胞として、免疫活性が増強されている培養細胞を提供することを課題としており、さらにまた、この出願の発明は、上記の免疫活性増強剤を利用して、in vivo、すなわち生体内で誘起、増強される免疫活性に関する研究のモデル動物として、免疫活性が増強されている非ヒト哺乳動物を提供することも課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

この出願の発明は、上記の課題を解決する手段として、以下の(1)から(19)の発明を提供する。

(1) 哺乳動物の免疫活性を増強させる免疫活性増強剤において、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを有効成分として含有することを特徴とする哺乳動物の免疫活性増強剤；

(2) 特殊核酸塩基は、8-オキソグアニン、8-オキソアデニン、2-オキソアデニン、5-ヒド

ロキシウラシル、5-ホルミルウラシル、5-ホルミルシトシン、8-ニトログアニン、チミン、グリコール、シトシグリコール、ヒポキサンチン、オキザニン、ピリミジンダイマー、 O^6 -メチルグアニンおよび O^4 -メチルチミンからなる群から少なくとも1種類が選択される

(1)に記載の免疫活性増強剤；

(3) 特殊核酸塩基は、微生物核酸特異的な修飾塩基である(1)に記載の免疫活性増強剤；

(4) 微生物核酸特異的な修飾塩基は、 N^6 -メチルアデニン、5-ヒドロキシメチルウラシルおよび5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から少なくとも1種類が選択される(3)に記載の免疫活性増強剤；

(5) 微生物核酸特異的な修飾塩基を含む核酸は、配列番号4の塩基配列を有する核酸である(3)に記載の免疫活性増強剤；

(6) 微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸を有するプラスミドを有効成分としてさらに含有する(1)から(5)のいずれかに記載の免疫活性増強剤；

(7) 微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸は、配列番号2の塩基配列を有する核酸である(6)に記載の免疫活性増強剤；

(8) 微生物が、ウイルスまたは細菌である(3)から(7)のいずれかに記載の免疫活性増強剤；

(9) 細菌が、大腸菌である(8)に記載の免疫活性増強剤；

(10) 上記(1)から(9)のいずれかに記載の免疫活性増強剤を培養細胞に投与することによって、培養細胞の免疫活性を増強させて炎症性サイトカインを生産させることを特徴とする炎症性サイトカインの生産方法；

(11) 上記(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(8)および(9)のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸を組込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を培養細胞に同時投与することによって、免疫活性をさらに増強させて炎症性サイトカインを生産させることを特徴とする炎症性サイトカインの生産方法；

(12) 上記(1)から(9)のいずれかに記載の免疫活性増強剤を培養細胞に投与することによって、免疫活性が増強され、炎症性サイトカインが生産されることを特徴とする培養細胞；

(13) 上記(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(8)および(9)のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸を組込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を培養細胞に同時投与することによって、免疫活性がさらに増強され、炎症性サイトカインを生産されることを特徴とする培養細胞；

(14) 培養細胞が、ヒトを含む哺乳動物由来である(12)または(13)に記載の培養細胞；

(15) 上記(1)から(9)のいずれかに記載の免疫活性増強剤を哺乳動物に投与することによって、哺乳動物の免疫活性を増強させることを特徴とする哺乳動物の免疫活性の増強方法；

(16) 上記(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(8)および(9)のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸を有するプラスミドを有効成分として含有する組成物を哺乳動物に同時投与することによって、哺乳動物の免疫活性をさらに増強させることを特徴とする哺乳動物の免疫活性の増強方法；

(17) 上記(1)から(9)のいずれかに記載の免疫活性増強剤を非ヒト哺乳動物に投与することによって、免疫活性が増強されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物；

(18) 上記(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(8)および(9)のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸を有するプラスミドを有効成分として含有する組成物を哺乳動物に同時投与することによって、免疫活性がさらに増強されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物；および

(19) 非ヒト哺乳動物が、マウスである(17)または(18)に記載の非ヒト哺乳動物。

【発明の効果】

【0011】

この出願の発明によって、特殊核酸塩基を含む核酸、または、その核酸を有するプラスミドを有効成分として、哺乳動物に投与することにより、哺乳動物の生体全体の免疫活性を増強させることができ、癌免疫療法や遺伝子治療、種々の感染症に対しても効果的なDNAワクチン等に应用することができる免疫活性増強剤が提供される。

【0012】

また、上記の免疫活性増強剤を利用して、哺乳動物の生体全体の免疫活性を増強させることができる免疫活性の増強方法が提供される。

【0013】

さらに、上記の免疫活性増強剤を利用して、炎症性サイトカインを効率よく生産させることができる培養細胞およびこの細胞を用いた炎症性サイトカインの生産方法が提供される。

【0014】

さらにまた、上記の免疫活性増強剤によって、生体内で誘起、あるいは、増強される免疫活性に関する研究のin vivoにおけるモデル動物として免疫活性が増強された非ヒト哺乳動物をも提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について詳しく説明する。

【0016】

この出願の発明の哺乳動物の免疫活性増強剤は、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、任意のプラスミド中にこの特殊核酸塩基を含む核酸を有しているものを有効成分として含有することを特徴としている。

【0017】

この出願の発明における「特殊核酸塩基」とは、DNA成分として特殊な塩基、あるいは、RNA成分として特殊な塩基等のように、核酸中の成分として、特殊な塩基を意味する。具体的には、たとえば、微生物核酸特異的な修飾塩基等のようなアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル以外の塩基であり、これら特殊な塩基を有するDNAやRNA等の核酸により、哺乳動物の免疫系が非自己であると区別・認識して、免疫活性を増強・促進させたりすることができるものである。より具体的な例を挙げると、たとえば、ヒドロキシ化、メチル化等の種々の修飾が施された塩基等があり、8-オキソグアニン、8-オキソアデニン、2-オキソアデニン、5-ヒドロキシウラシル、5-ホルミルウラシル、5-ホルミルシトシン、8-ニトログアニン、チミングリコール、シトシングリコール、ヒポキサンチン、オキザニン、ピリミジンダイマー、 0^6 -メチルグアニンおよび 0^4 -メチルチミン等が挙げられる。これらは、単独での使用はもちろん、これら複数を組み合わせて使用してもよい。

【0018】

また、「プラスミド」は、哺乳動物の細胞中でプラスミドが保有する各遺伝子を発現しなくてもよく、その種類は特に限定されるものではないが、たとえば、pQBI63、pcDNA等を使用することができる。

【0019】

「微生物核酸特異的な修飾塩基」とは、微生物中に特異的に保有されている、上記のような特殊な塩基のことを意味する。この微生物核酸特異的な修飾塩基によって、哺乳動物の免疫系は、自己（哺乳動物）と非自己（細菌類等の微生物）とを区別・認識して、免疫活性を増強促進させることができる。この微生物核酸に特異的な修飾塩基は、この出願の発明の効果を発揮することのできるものであれば、その種類は特に限定されるものではないが、 N^6 -メチルアデニン、5-ヒドロキシメチルウラシル、5-ヒドロキシメチルシトシン等を例示することができ、これらは、単独、または、複数組み合わせ使用してもよい。

【0020】

特に、微生物核酸特異的な修飾塩基が N^6 -メチルアデニンである場合は、この N^6 -メチルアデニンは、「GATC配列」を優先的に選択しアデニン (A) のN-6位をメチル化するため、修飾塩基の修飾対象となる塩基を含む塩基配列はGATC配列であることが好ましく、具体的には、配列番号4に示した塩基配列であることがさらに好ましい。

【0021】

この微生物核酸特異的な修飾塩基は、たとえば、大腸菌をはじめとする各種の細菌類やウイルス等の微生物から公知の方法によって、単離した天然由来のDNAやRNA等の核酸を使用することができ、また、たとえば、公知の方法で人工的に修飾塩基を付加した核酸（人工オリゴヌクレオチド）を合成、作成したものをすることもできる（たとえば、Cowdery, J.S., et al., J. Immunol., 156, 4570-4575, 1996等）。

【0022】

なお、この出願の発明は、特殊核酸塩基を含む核酸の誘導体を用いることもできる。この「誘導体」とは、化学合成品を用いる場合にリン酸部および糖部が修飾されているものや、塩基部以外の骨格を変換したもの等であり、たとえば、ホスホロチオエート修飾や2'-O-メチルRNA、ペプチド核酸 (PNA) 等を使用することができる。

【0023】

さらに、前記のとおり、哺乳動物には、CpGジヌクレオチド配列 (CpG配列) をほとんど有しておらず、有していてもこのCpG配列に特異的なシトシン5-メチラーゼにより5位がメチル化されているため、この差異を生体の免疫系が認識し、免疫活性を増強・誘起させることから、この出願の発明の免疫活性増強剤は、その有効成分として、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸、または、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸を有するプラスミドをさらに含有することにより、哺乳動物の免疫活性をさらに増強させることができる。具体的には、非メチル化CpG配列を有する核酸は、たとえば、配列番号2に示した塩基配列であることが好ましい。

【0024】

この出願の発明における「微生物」とは、ウイルスや細菌類であり、特に細菌については、その扱い方や知見等が豊富に蓄積されている大腸菌であることが好ましい。

【0025】

この出願の発明は、上記に例示した各免疫活性増強剤を培養細胞に、カチオニック脂質とともに投与方法やマイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法等の公知の方法に従って投与して、培養細胞の免疫活性を増強させて、炎症性サイトカインが効率よく生産することのできる培養細胞を提供することもでき、in vitroにおける免疫活性の実験モデル細胞として使用することができる。また、この培養細胞を利用することにより、効率よく炎症性サイトカインを生産させ、取得することもできる。そして、生産されたこの炎症性サイトカインを公知の方法で抽出、精製等することにより、治療薬剤等の各種用途に使用することができる。

【0026】

また、免疫活性をさらに増強させるために、上記の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を有する核酸を組込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を組み合わせて、任意の培養細胞に同時投与してもよい。

【0027】

なお、「培養細胞」は、その種類や由来等は特に制限されるものではないが、たとえば、生物個体の組織や細胞、具体的には、植物細胞や昆虫細胞、哺乳類細胞等を使用することができ、また、これらの組織としての構成の各種のものであってもよい。特に、この出願の発明は、哺乳動物の免疫系を増強促進させることから、使用する培養細胞は、ヒトを含む哺乳動物由来であることが好ましい。たとえば、ヒト、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス、ラット、ウサギ等の由来の培養細胞を使用することができる。

【0028】

さらにまた、この出願の発明は、上記に例示した各免疫活性増強剤を哺乳動物に投与することによって、哺乳動物の免疫活性を増強させることができる、哺乳動物個体の免疫活性の増強方法でもある。

【0029】

この出願の発明の免疫増強剤を哺乳動物に投与する際には、核酸の状態で投与することもできるが、好ましくは投与形態にあわせて各種の薬理成分を含有させて投与し、免疫活性を増強させる。この「薬理成分」とは、第1には、通常の薬剤製造に用いられる各種の担体を意味する。担体は、対象疾患の種類や薬剤の投与形態に応じて広い範囲から適宜に選択することができるが、経口的にまたは注射により投与しうる単位服用形態にあることが望ましい。特に、注射による投与の場合には、局所注入、腹腔内投与、選択的静脈内注入、静脈注射、皮下注射、臓器灌流液注入等を採用することができる。

【0030】

懸濁剤およびシロップ剤のような経口液体調製物は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、ゴマ油、大豆油等の油類、アルキルパラヒドロキシベンゾエート等の防腐剤、ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造することができる。

【0031】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の表面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製剤化することができる。錠剤やカプセルを製造する際には、固体の製薬担体が用いられる。

【0032】

また、注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物、各種の緩衝液等からなる担体を用いて製剤化することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調製するようにしてもよい。

【0033】

なお、この出願の発明の免疫増強剤の投与量は、投与対象の哺乳動物の体重、症状、投与経路等によって異なることに留意する必要がある。

【0034】

薬理成分の第2は、免疫活性増強剤を細胞内に導入可能な形態とするための成分である。たとえば、この免疫活性増強剤の有効成分である微生物の核酸に特異的な修飾塩基を含む核酸、または、これを含むプラスミドの構造や機能を変更することなく、かつ、薬理学的に許容される溶液にこの核酸、または、プラスミドを混合して組成物とすることができる。このような組成物は、たとえば、マイクロインジェクション法により細胞内に導入する方法や、脂質（たとえば、BioPORTER (Gene Therapy Systems社、米国) 等）やペプチド性試薬（たとえば、Chariot (Active Motif社、米国) 等）を用いた細胞内導入法、また、金粒子に付着させて遺伝子銃によって標的細胞に導入することもできる。

【0035】

さらにまた、上記のとおり、哺乳動物の免疫系は、哺乳動物のメチル化CpG配列と微生物特異的な非メチル化CpG配列とを区別し、哺乳動物の免疫活性を増強・誘起することから、上記の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化CpG配列を含む核酸を有するプラスミドを有効成分として含有する組成物を組み合わせて哺乳動物に同時投与することにより、さらに免疫活性を増強させることができる。

【0036】

そして、この出願の発明における「哺乳動物」とは、ヒトを含むサル、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス、ラット、ウサギ等の哺乳動物を例示することができる、免疫活性増強剤の投与対象とすることができる。

【0037】

このように、この出願の発明が提供する哺乳動物の免疫活性増強剤およびこれを用いた免疫活性の増強方法によれば、哺乳動物の免疫活性を増強させることにより、癌免疫療法や遺伝子治療、種々の感染症に対する効果的なDNAワクチン開発等への応用が期待できる。

【0038】

さらに、この出願の発明は、上記のとおりの特種核酸塩基を含む核酸、その誘導体、または、その核酸を含むプラスミド等によって、*in vivo*、すなわち生体内で誘起、あるいは、増強される免疫活性に関する研究のモデル動物として提供することもできるが、この場合は、ヒトを除いた非ヒト哺乳動物であることが重要である。たとえば、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス、ラット、ウサギ等が挙げることができ、特に豊富な知見等が蓄積され、また多くの研究室で実験モデル動物として利用されているマウスとすることが、その扱い易さ等の観点からも好ましい。このような実験モデル動物によって、たとえば、Gm⁶ATC配列のような特種核酸塩基（修飾塩基）による炎症誘起（免疫活性）のメカニズムの解明に貢献することができる。

【0039】

以下に、m⁶Aを含有または欠損した合成核酸（オリゴヌクレオチド）およびこれを含んだプラスミドを調製し、これら各々をBalb/cマウスに投与し、誘起された炎症反応の強度について炎症性サイトカインを指標にして検討して実施例として示し、さらに詳しく、この出願の発明について説明する。もちろん、以下の例によってこの出願の発明が限定されることはない。

【実施例】

【0040】

1. Gm⁶ATC配列による炎症反応の誘導

(1) Gm⁶ATC配列と非メチル化CpG配列の合成

表1に示したホスホロチオエート安定化オリゴヌクレオチド（ODN）は、公知の方法（たとえば、Cowdery, J.S., et al., J. Immunol., 156, 4570-4575, 1996等）に従い、GATC配列とGm⁶ATC配列、非メチル化CpG配列とメチル化CpG配列の4種類の配列をそれぞれ合成した（Sigma Genosys Japan）。この合成ODNは、1nmol/ μ lとなるようにEndotoxine free TE緩衝液（QIAGEN社）に溶解して調製した。次いで、Limulus Amoebocyte Lysate assay（LAL試験；PYROGENT、BioWhittaker）を行ない、この合成ODN溶液中のエンドトキシンの含有量が、0.006EU/ml以下であることを確認した。

【0041】

【表1】

ODN	Motif	Sequence (5'-3')
GpC-ODN1720	non CpG	TCC ATG AGC TTC CTG ATG CT
CpG-ODN1668	CpG	TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT
GATC-dA	non-m ⁶ A	TCC ATG ATC TTC CTG ATG CT
GATC-m ⁶ A	m ⁶ A	TCC ATG m ⁶ ATC TTC CTG ATG CT

(2) Gm⁶ATC配列、非メチル化CpG配列の投与

(i) Gm⁶ATC配列、非メチル化CpG配列の単独投与

表1に示した、GATC-dA（GATC配列を含む配列）、GATC-m⁶A（Gm⁶ATC配列を含む配列）、CpG-ODN1668（非メチル化CpG配列を含む配列）およびGpC-ODN1720（メチル化CpG配列を含む配列）をそれぞれ10nmol採取し400 μ lの生理食塩水に溶解して、Balb/cマウス（オス、6週齢；三協ラボサービス）の腹腔内投与し、その2時間後に血清中の炎症性サイトカイン（IL-6、IL-12およびTNF- α ）の濃度を酵素結合免疫吸着検定法（ELISA法；AN'ALYZA

、Genzyme THCHNE corp.) で測定した。

【0042】

なお、血清は、投与2時間後に、マウスの心臓から採血し、4℃にて一晩置き、遠心分離処理 (20000g、20分間、4℃) にて回収した。

【0043】

結果は、図1から図3に示したとおりである。図1はIL-6における測定値 (pg/ml)、図2はIL-12における測定値 (pg/ml)、図3はTNF- α における測定値 (pg/ml) である。なお、図1から図3に示した結果は、平均値±標準偏差で示し、図中の米印2つは「P<0.01」、米印3つは「P<0.005 (n=3(IL-12)、4(IL-6、TNF- α))」を示している。

【0044】

GpC-ODN1720における測定値は、IL-6: 28pg/ml、IL-12: 33pg/ml、TNF- α : 47pg/mlであり、炎症性サイトカインはほとんど誘導することにはなかった。だが、CpG-ODN1668を投与した場合は、非常に強い炎症性サイトカインが誘導され、その測定値は、IL-6: 2.1ng/ml、IL-12: 1.0ng/ml、TNF- α : 1.5ng/mlであった。

【0045】

一方、GATC-dAとGATC-m⁶Aとの炎症性サイトカインの誘導比較では、GATC-m⁶Aは、CpG-ODN1668の投与の場合よりも若干少なかったものの、GATC-dAよりも有意に誘導されることを確認した。すなわち、GATC-m⁶Aの測定値はIL-6: 39pg/ml、IL-12: 160pg/ml、TNF- α : 150pg/ml、GATC-dAの測定値はIL-6: 14pg/ml、IL-12: 48pg/ml、TNF- α : 92pg/mlであった。このことは、アデニンのメチル化 (m⁶A) により、特異的に炎症性サイトカインが誘導されることを示している。また、非メチル化CpG配列において、その前後の配列によって免疫誘導能が異なることが知られている (Kreig, A., et al., Nature, 374: 546-549, 1995等) ことから、Gm⁶ATC配列においても、その前後の配列を最適化することにより、Gm⁶ATC配列の単独投与でも強い免疫誘導効果を期待することができる。

(ii) Gm⁶ATC配列と非メチル化CpG配列との同時投与

微生物由来のDNA (核酸) は、m⁶Aだけでなく非メチル化CpG配列を含んでいる。たとえば、非ウイルスベクターによる末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease) に対する遺伝子治療では、Gm⁶ATC配列と非メチル化CpG配列が含まれたプラスミドを利用している (たとえば、Baumgartner, I., et al., Circulation, 97, p1114-1123, 1998等)。

【0046】

そこで、Gm⁶ATC配列と非メチル化配列を含むCpG-ODN1668を同時にマウスに投与して、炎症性サイトカインの誘導効果を確認した。Gm⁶ATC、GATC-dA、CpG-ODN1668のそれぞれの投与量は、5nmolのCpG-ODN1668に対して、等molのGm⁶ATCまたはGATC-dAを混合し、400 μ lの生理食塩水に溶解して、これをマウスに投与し、2時間後にこのマウスの血清中における炎症性サイトカインの測定をELISA法で行ない、誘導量を確認した。

【0047】

結果は、図4から図6に示したとおりである。図4はIL-6における測定値 (pg/ml)、図5はIL-12における測定値 (pg/ml)、図6はTNF- α における測定値 (pg/ml) である。なお、図4から図6に示した結果は、平均値±標準偏差 (n=4) で示し、図中の米印1つは「P<0.05」、米印2つは「P<0.01」、米印3つは「P<0.005」を示している。

【0048】

すなわち、CpG-ODN1668単独投与の場合は、IL-6: 530pg/ml、IL-12: 730pg/ml、TNF- α : 760pg/mlであった。また、CpG-ODN1668とGATC-dAとの同時投与の場合は、IL-6: 710pg/ml、IL-12: 720pg/ml、TNF- α : 1200pg/mlであった。そして、CpG-ODN1668とGm⁶ATCとの同時投与の場合は、IL-6: 1600pg/ml、IL-12: 1100pg/ml、TNF- α : 2900pg/mlと、顕著に高いサイトカイン濃度が誘導されることを確認できた。この濃度は、CpG-ODN1668単独投与およびCpG-ODN1668+GATC-dAの投与と比較して2-3倍の濃度であり、m⁶Aと非メチル化CpG配列がともに存在すると、非常に強く炎症性サイトカインが誘導、増強されることが確認された。

2. Gm⁶ATC配列を含む核酸 (オリゴヌクレオチド) を組込んだプラスミドによる炎症反応

の誘導

(1) プラスミドの調製

実際の遺伝子治療で使用するプラスミドを用いて、プラスミドに含まれるGm⁶ATC配列によって、誘起される炎症反応を検討した。

【0049】

プラスミドは、哺乳動物の細胞内では遺伝子発現を行わないプラスミドpQBI63を使用した。ホスト菌として、メチラーゼ活性を有する大腸菌DH5 α (dam⁺)とメチラーゼ活性を有さない大腸菌SCS110(dam⁻)を用意し、それぞれの大腸菌にプラスミドpQBI63を公知の方法(たとえば、ヒートショック法やエレクトロポレーション法等)で導入し、Endo free plasmid mega kit (QIAGEN社)を用いて調製・精製した。

【0050】

なお、pQBI63をDH5 α (dam⁺)に導入し調製したものをpQBI63/DH5 α とし、SCS110(dam⁻)に導入し調製したものをpQBI63/SCS110とした。調製後のプラスミドpQBI63/DH5 α およびpQBI63/SCS110は、低融点アガロース電気泳動で分取し、その後、QIA-tip100 (QIAGEN社)またはMicropure-EZ (Millipore社)を用いて精製し、上記1. (1)と同様にLAL試験 (PYROGENT、BioWhittaker社)を行ない、エンドトキシンの含有量が0.006EU/ml以下であることを確認した。

(2) in vitroでのメチル化反応

上記(1)により得られたpQBI63/SCS110を90 μ g採取し、120 μ lのメチラーゼバッファ (50mM Tris-HCl、10mM EDTA、5mM 2-メルカプトエタノール (pH 7.5)) 中に入れ、19.2UのDamメチラーゼ (New England BioLabs Inc.)を用いて37℃にて一晩反応させた。この時、メチル基供与体であるS-アデノシルメチオニン (SAM; New England BioLabs Inc.)を80 μ Mとなるよう添加しアデニンをメチル化したものをpQBI63/SAM+、添加せずmockメチル化体としたものをpQBI63/SAM-とした。反応終了後、pQBI63/SAM+およびpQBI63/SAM-を、上記2. (1)と同様にEndo free plasmid mega kit (QIAGEN社)を用いて精製し、エンドトキシンを除去し、混入を防止した。

(3) プラスミドの投与

発明者は、非ウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、大腸菌から調製したプラスミドをカチオン性脂質とともに投与する方法は、今後一般的に使用されと考え、この出願の発明におけるプラスミドの投与をカチオン性脂質とともに投与する実施例を一例として示した。

【0051】

上記2. (1)にて調製したpQBI63/DH5 α およびpQBI63/SCS110、また、上記2. (2)にて調製したpQBI63/SAM+およびpQBI63/SAM-、それぞれをカチオン性脂質 (カチオン性リポソーム)であるLipofectin (Invitrogen社)と複合体を形成させ、尾静脈よりマウスに投与した。投与4時間後、上記と1. (2) (i)と同様に血清を採集し、この血清中のIL-6およびIL-12の炎症性サイトカインの濃度 (pg/ml)をELISA法にて測定、定量した。

【0052】

結果は、図7に示したとおりであり、平均値 \pm 標準偏差で示し、米印1つは「P<0.05 (n=3)」を示している。

【0053】

まず、IL-12における測定結果は、pQBI63/DH5 α によって、420pg/mlまで誘導されたのに対して、pQBI63/SCS110を投与することによって、IL-12の誘導が140pg/mlに低下した。

【0054】

つぎに、pQBI63/SCS110をS-アデノシルメチオニンの存在下でDam処理を行ない、アデニンをメチル化したpQBI63/SAM+を投与することにより、IL-12は、pQBI63/DH5 α と同程度の320pg/mlに誘導された。また、S-アデノシルメチオニンの非存在下でDam処理を行なったpQBI63/SAM-の場合は、pQBI63/SCS110と同程度の140pg/mlを誘導した。

【0055】

そして、IL-6の測定結果は、IL-12ほど強い誘導は確認されなかったが、その傾向はIL-12とほぼ同様であったことを確認された。つまり、Gm⁶ATC配列によって炎症反応が誘導、増強されること示すものである。

【0056】

なお、コントロールであるLipofectinの単独投与時のIL-12およびIL-6それぞれの血清中濃度は、検出限界値以下 (<7.8pg/ml) であった。

【産業上の利用可能性】

【0057】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、特殊核酸塩基を含む核酸、または、この特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを用いた、免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法が提供され、免疫活性のメカニズムの解明や癌免疫療法や種々の感染症に対しても効果的なDNAワクチン開発等への応用に期待することができる。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】 マウスへのGm⁶ATC配列または非メチル化CpG配列の単独投与の結果である、IL-6の測定結果を示した図である。

【図2】 マウスへのGm⁶ATC配列または非メチル化CpG配列の単独投与の結果である、IL-12の測定結果を示した図である。

【図3】 マウスへのGm⁶ATC配列または非メチル化CpG配列の単独投与の結果である、TNF- α の測定結果を示した図である。

【図4】 マウスへのGm⁶ATC配列と非メチル化CpG配列との同時投与の結果である、IL-6の測定結果を示した図である。

【図5】 マウスへのGm⁶ATC配列と非メチル化CpG配列との同時投与の結果である、IL-12の測定結果を示した図である。

【図6】 マウスへのGm⁶ATC配列と非メチル化CpG配列との同時投与の結果である、TNF- α の測定結果を示した図である。

【図7】 マウスへのGm⁶ATC配列を含むプラスミドの投与の結果である、IL-6およびIL-12の測定結果を示した図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency
<120> Immunity activity reinforcement agent
<130> NP03416-JN
<160> 4
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GpC-ODN1720, the motif is "non-CpG"

<400> 1
tccatgagct tcctgatgct 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CpG-ODN1668, the motif is "CpG"

<400> 2
tccatgacgt tcctgatgct 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GATC-dA, the motif is "non-m6A"

<400> 3
tccatgatct tcctgatgct 20

<210> 4

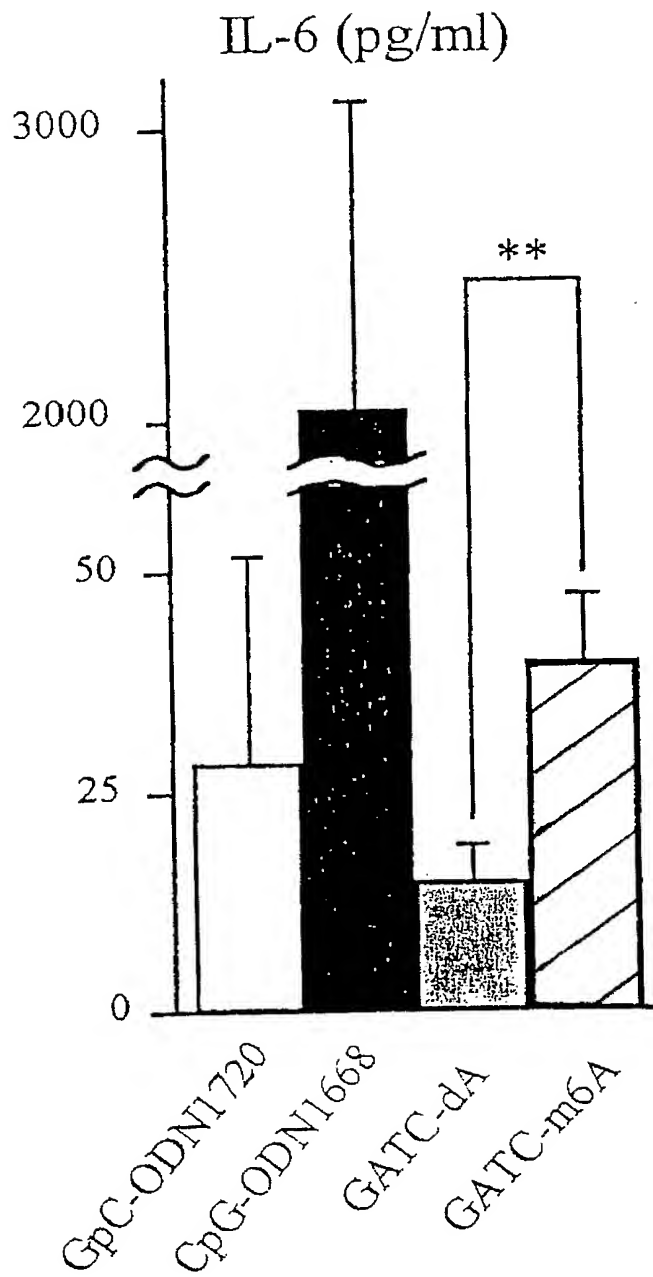
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> n=N6-methyladenin (m6A)
<223> GATC-m6A, the motif is "m6A"

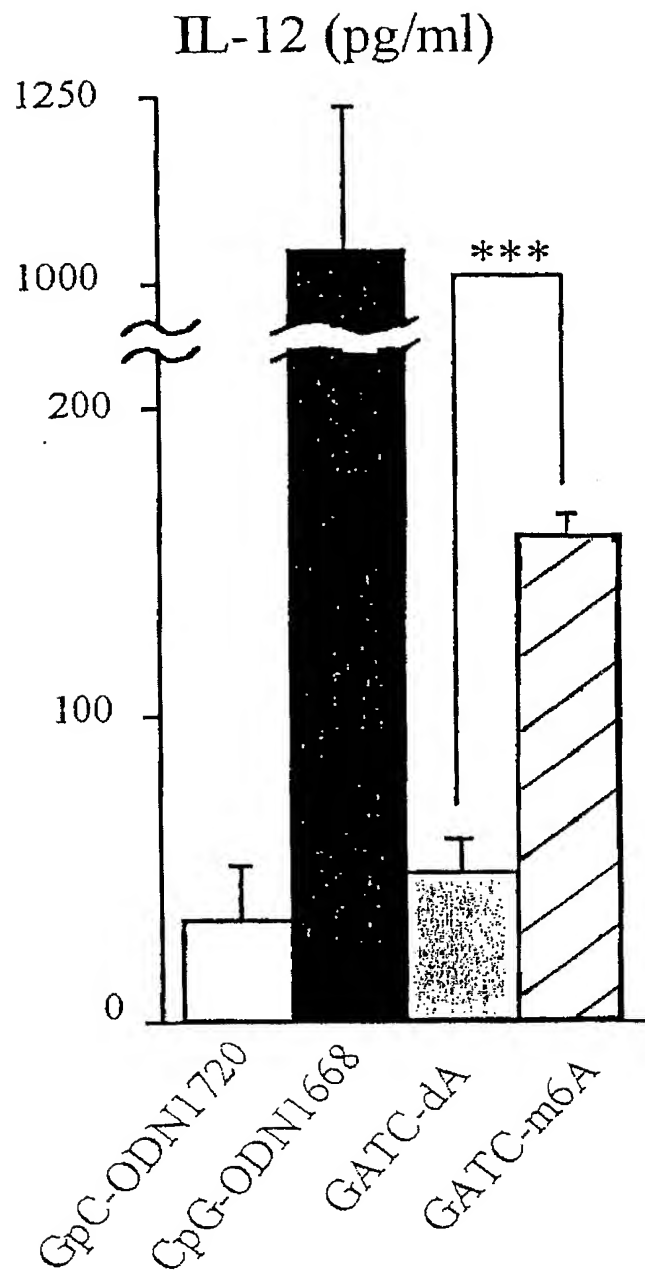
<400> 4
tccatgntct tcctgatgct

20

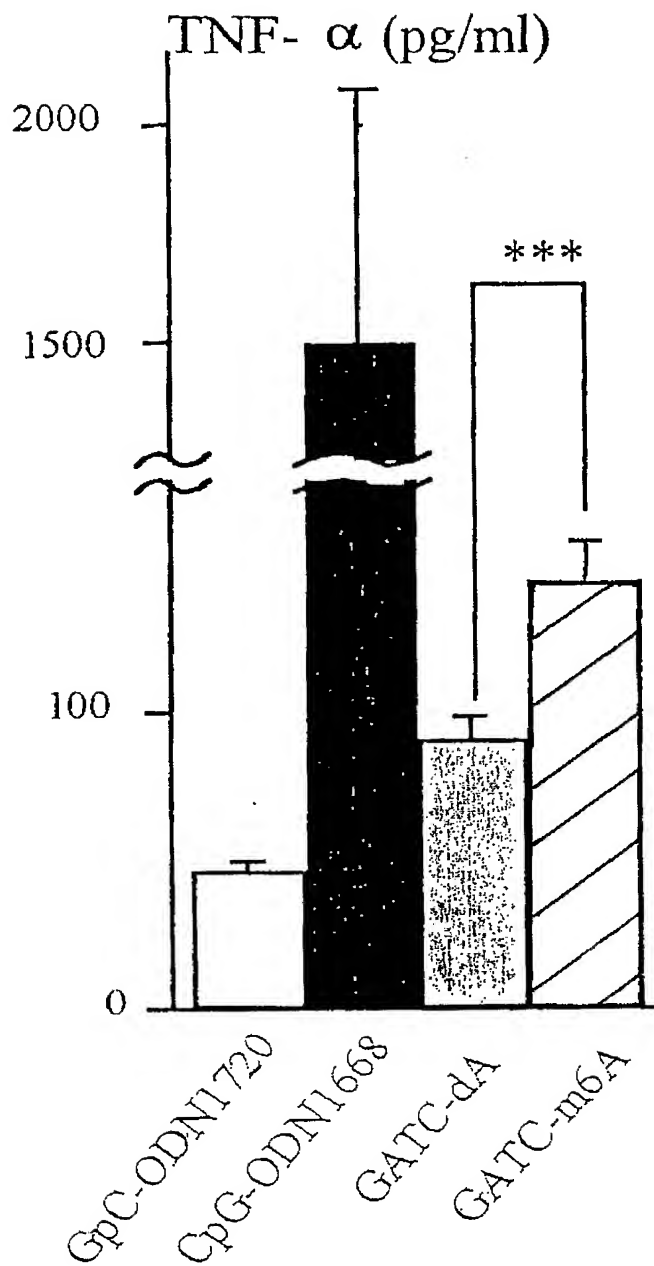
【書類名】 図面
【図 1】



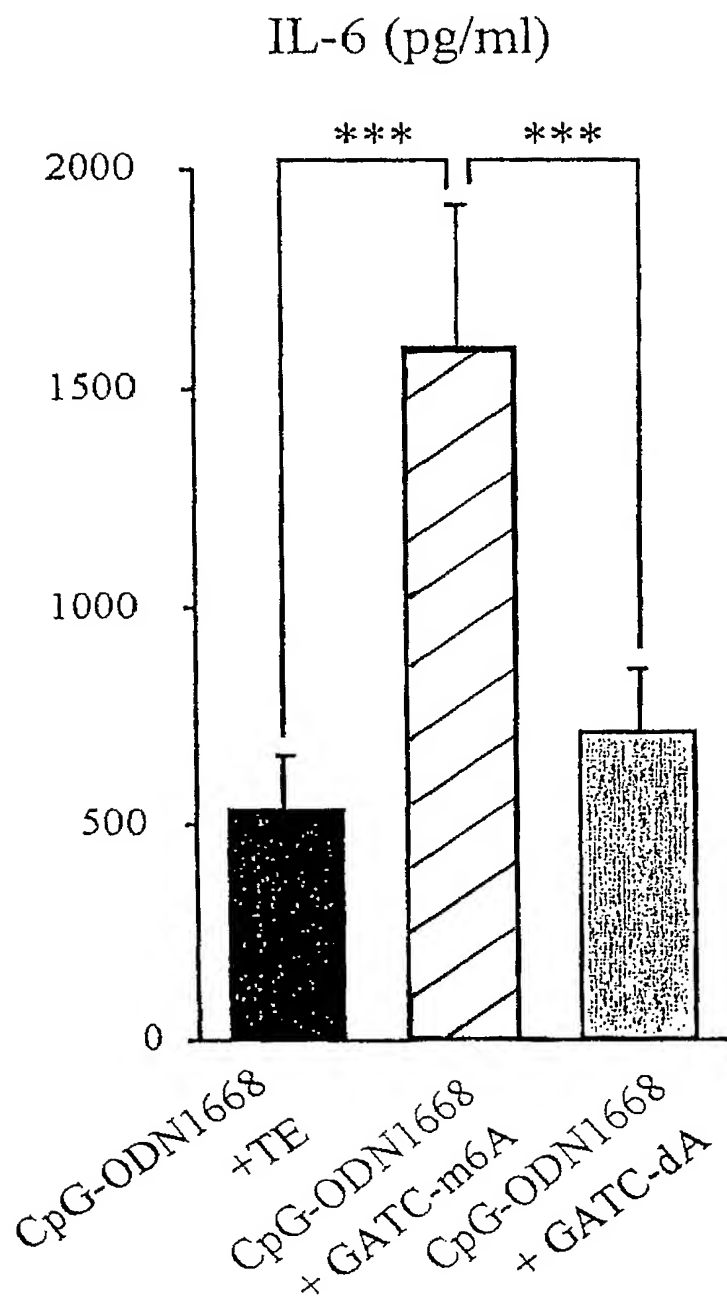
【図 2】



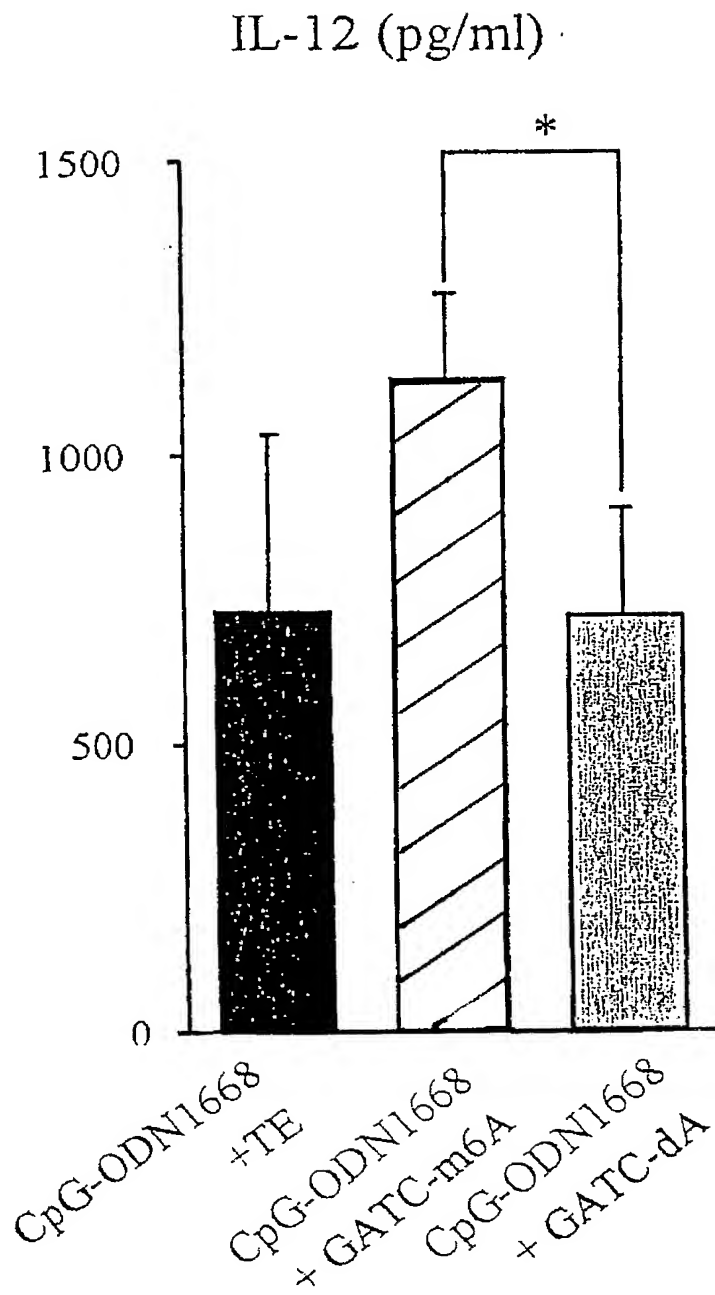
【図 3】



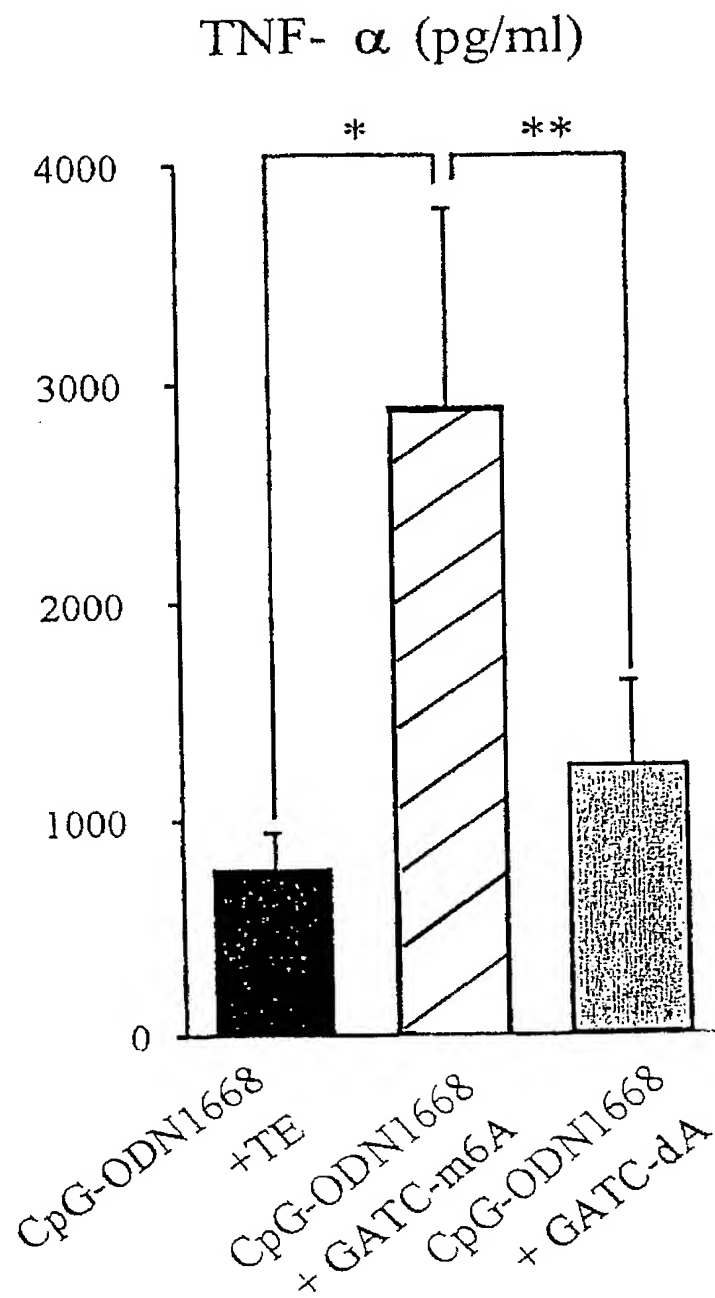
【図4】



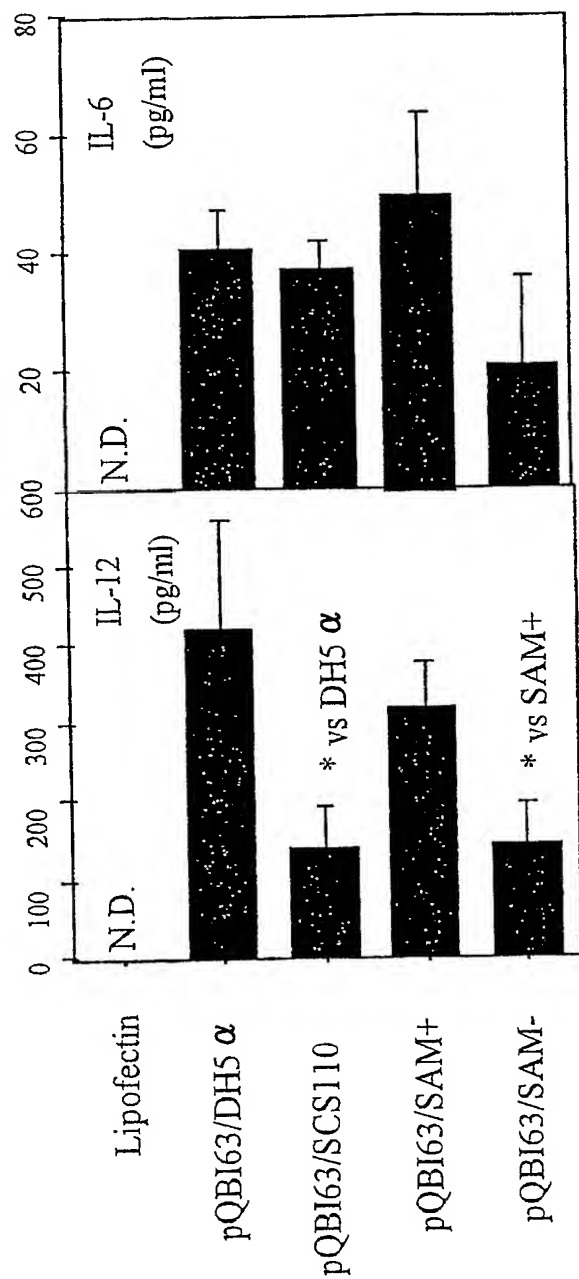
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、この特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを用いた、免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法を提供する。

【解決手段】 哺乳動物の免疫活性を増強させる免疫活性増強剤において、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを有効成分として含有することを特徴とする。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 3 1 0 0 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 4 月 1 日
[変更理由] 名称変更
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名 独立行政法人科学技術振興機構